AUS DER UNIVERSITÄTSFRAUENKLINIK TÜBINGEN
DIREKTOR: PROFESSOR DR. H. ROEMER

Untersuchungen über Phosphatasen im Ovar des Menschen und des Schweines

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Margarete Schmid
aus Sindelfingen

1964

7745

AUS DER UNIVERSITÄTSFRAUENKLINIK TÜBINGEN
DIREKTOR: PROFESSOR DR. H. ROEMER

Untersuchungen über Phosphatasen im Ovar des Menschen und des Schweines

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Margarete Schmid
aus Sindelfingen

Herrn Dozenten Dr. G. JUNG danke ich aufrichtig für die Überlassung des Themas und für seine wertvolle Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Dekan: Professor Dr. Dr. E. Fröhlich
1. Berichterstatter: Dozent Dr. G. Jung
2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Roemer

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
A. LITERATURTEIL	
I. Allgemeines über Phosphatasen	3
1. alkalische Phosphatase	4
2. saure Phosphatase	4
3. Adenosintriphosphatase (ATPase)	5
II. Alkalische und saure Phosphatase sowie ATPase im Ovar	
1. Gesamtovar	6
2. Liquor folliculi	9
3. Corpus luteum	9
4. Corpus rubrum	10
5. Phosphatasen in Geschwülsten	10
B. EXPERIMENTELLER TEIL	
I. Methodik	
1. Herstellung der Homogenate und Gewinnung der Zellfraktionen	11
2. Bestimmung der Fermentaktivität	
a) alkalische Phosphatase	13
b) saure Phosphatase	14
c) Adenosintriphosphatase (ATPase)	15
3. Colorimetrische Phosphorbestimmung	17

Seite

II. Ergebnisse 20

1. Untersuchungen an menschlichen Ovarien

a) Gesamtovar und besondere Befunde 21

1) Klimakterische und praeklimakterische Ovarien 21

2) Ovarien in der Menopause 22

3) Ovarialcarcinom 23

4) Ovar bei Adeno-Carcinom corporis uteri 25

5) Verschiedene Befunde 25

b) Corpus luteum 27

2. Untersuchungen an Schweineovarien 28

3. Intrazelluläre Verteilung der Aktivität der alkalischen und sauren Phosphatase sowie der ATPase

a) alkalische und saure Phosphatase 29

b) ATPase 34

Diskussion 42

Zusammenfassung 47

Literaturverzeichnis 48

Einleitung

ROEMER[32] konnte im Jahr 1946 im Harn gesunder, geschlechtsreifer Frauen an bestimmten Tagen des ovariellen Cyclus ein spezifisches proteolytisches Ferment nachweisen. Diese "Uro-Ovoproteinase" trat bei biphasischem Cyclus regelmäßig während der Menstruation und zur Zeit des Follikelsprungs auf. JUNG und HELD[15] nahmen diese Beobachtung zum Anlaß, die Follikelflüssigkeit des Schweineovars auf das Vorhandensein von Proteinasen und - in Erweiterung der Fragestellung - von alkalischer und saurer Phosphatase, von Lipasen und Esterasen zu untersuchen, um von den Ergebnissen dieser Untersuchungen ausgehend Rückschlüsse auf das menschliche Ovar ziehen zu können, das als Entstehungsort der nachgewiesenen Uro-Ovoproteinase angenommen wurde. Alle genannten Fermente wurden in der Follikelflüssigkeit gefunden.

Im Anschluß hieran gelang es JUNG und E. KIDESS[17], in von heranreifenden Follikeln befreiten Schweineovarien eine außerordentlich hohe, in wenigen untersuchten menschlichen Ovarien eine niedrigere Proteinaseaktivität festzustellen. Die Ergebnisse ließen den Schluß zu, daß es sich hierbei um Gewebsfermente handelt, die vermutlich von den Granulosazellen gebildet und an die Follikelflüssigkeit abgegeben werden.

Schließlich fanden JUNG und A. KIDESS[16] im Corpus luteum des Schweineovars eine proteolytische Fermenttätigkeit, die diejenige des Gesamtovars noch weit übertrifft, im Corpus rubrum dagegen nur knapp 1/10 der Proteinaseaktivität des Corpus

luteum. Weiter untersuchten JUNG und A. KIDESS[16] die Aktivität der alkalischen und sauren Phosphatase im Corpus luteum des Schweineovars.

Während die oben genannten Untersuchungen vorwiegend Ovargewebe vom Schwein zum Gegenstand hatten, soll in der vorliegenden Arbeit die Aktivität der alkalischen und sauren Phosphatase sowie der Adenosintriphosphatase im menschlichen Ovar bestimmt werden. Aus naheliegenden Gründen müssen die Versuche fast ausschließlich an klimakterischen und praeklimakterischen Ovarien durchgeführt werden; denn bei fertilen Frauen ist nur selten - außer bei Ovarialtumoren - die Indikation zur operativen Entfernung der Ovarien gegeben.

Weiterhin interessiert die Frage, ob die Aktivität der genannten Fermente bei Ovarialcarcinomen und verschiedenen besonderen Befunden verändert ist.

Um auch für die Adenosintriphosphatase Vergleichsmöglichkeiten zu haben, möchten wir außerdem Aufschluß über ihre Aktivität im Schweineovar gewinnen.

A. LITERATURTEIL

I. Allgemeines über Phosphatasen[20]

Die Phosphatasen stellen eine Gruppe von Fermenten dar, deren Aufgabe in der Spaltung und Synthese der verschiedenen phosphorhaltigen Körperbausteine besteht. In der vorliegenden Arbeit wird darauf verzichtet, auf Vorkommen, chemische Natur, Wirkungsmechanismus und sonstige allgemeine Eigenschaften der Fermente einzugehen. Angaben hierüber mögen den Hand- und Lehrbüchern von FLASCHENTRÄGER-LEHNARTZ[8] und HOFFMANN-OSTENHOF[10] entnommen werden.

Die Substrate der Phosphatasen sind Ester der Phosphorsäure. Die zu besprechenden Fermente werden daher in die Gruppe der Esterasen eingereiht. Unter den Esterasen haben die Phosphatasen eine überragende physiologische Bedeutung. Die wichtigsten Stoffwechselvorgänge, wie Resorption, Aufbau und Abbau der Kohlenhydrate, Fette, Phosphatide und Eiweißkörper, das Knochenwachstum und die Harnsekretion, sind mit der Bildung und Spaltung von Phosphorsäureestern und daher auch mit der Wirksamkeit der Phosphatasen verknüpft.

Drei wichtige Merkmale ermöglichen eine Einteilung der Phosphatasen: Substratspezifität, pH-Optimum und Aktivierung sowie Hemmung ihrer Wirksamkeit durch Zusätze. Nach der Substratspezifität unterscheidet man z.B. Phosphomonoesterasen, Phosphodiesterasen, Pyrophosphatasen und die Adenylpyrophosphatase. In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivität

der Phosphomonoesterasen bei pH 9,0 und pH 5,0 sowie der Adenosintriphosphatase bei pH 9,1 bestimmt.

1. Die alkalische Phosphatase hat ihr pH-Optimum bei 9 - 10. Sie ist die bestbekannte Phosphatase und hydrolysiert Ester der mit 1 Alkoholgruppe veresterten Orthophosphorsäure. Man findet sie in fast allen tierischen Geweben, im Pflanzenreich besonders in fetthaltigen Samen. Von den tierischen Organen enthalten Darmschleimhaut und Niere am meisten, dann folgen Leber, Gehirn, Pancreas, Milz und Knochen. Auch im Blutplasma, in den Erythrozyten und in der Milch ist die alkalische Phosphatase enthalten.

   Charakteristisch sind die starke Aktivierung dieser Phosphatase durch Mg- und Mn-Salze, sowie ihre reversible Hemmung durch Alloxan. β-Glycerophosphat wird von ihr rascher gespalten als α-Glycerophosphat.

2. Die saure Phosphatase besitzt ihr pH-Optimum zwischen 5 und 6. Sie spaltet wie die alkalische Phosphatase Ester der mit 1 Alkoholgruppe veresterten Orthophosphorsäure und kommt in tierischen Geweben, wie Muskel, Leber, Niere, Pancreas, Milz und Prostata, sowie im Serum, in der Samenflüssigkeit und im Harn vor. Auch im Pflanzenreich ist sie zu finden.

   Wie die alkalische Phosphatase hydrolysiert die saure Phosphatase β-Glycerophosphat rascher als α-Glycerophosphat. Im Gegensatz zu jener wird sie jedoch nicht von Mg-Salzen aktiviert.

3. Die Adenosintriphosphatase (ATPase) spaltet einen Phosphorsäurerest aus Adenosintriphosphat (ATP) ab. Aus ATP entsteht hierbei Adenosindiphosphat (ADP). Während die Bindung von Phosphorsäure und Alkohol in einfachen Phosphorsäureestern verhältnismäßig wenig energiereich ist, wird bei der Abspaltung eines Phosphorsäurerestes aus ATP, einer sogenannten "energiereichen Phosphatverbindung", ein großer Energiebetrag für energieverbrauchende Vorgänge des biologischen Geschehens frei. Das ATP und andere energiereiche Phosphatverbindungen bewirken die Koppelung zwischen den energieverbrauchenden synthetischen Reaktionen und den energieliefernden Dissimilationsprozessen, wie sie vor allem beim Abbau der Kohlenhydrate vor sich gehen. Vor allem ist das ATP Energiespender für die Muskelkontraktion, wahrscheinlich auch für Vorgänge im Nervensystem.

HOFFMANN-OSTENHOF[10] bezeichnet eine Gruppe von Fermenten, die einen Phosphorsäurerest vom ATP abspaltet, als ATP-monophosphatasen. Das bestbekannte Ferment dieses Typus ist die Myosin-ATPase, die bisher trotz mehrfacher Umkristallisation nicht vom Myosin abgetrennt werden konnte. Ihr pH-Optimum liegt bei 9,0. Mg^{++} übt eine merkliche Hemmwirkung auf sie aus, während Ca^{++} die Aktivität verstärkt. Die Myosin-ATPase ist sehr hitzeempfindlich und wird in Lösung selbst bei Temperaturen unter 40° C schnell inaktiviert. Im Organismus wird ein "Protektor" angenommen, der diese Denaturierung verhindert.

Neben ihr gibt es im Sarkoplasma des Muskels nach KIELLEY und MEYERHOF[19] ein zweites Ferment mit der gleichen Wirk-

samkeit, das aber vom Myosin abtrennbar ist und sich auch dadurch von dem Enzym des Myosins unterscheidet, daß sein pH-Optimum bei 6,8 liegt und es durch Mg^{++} aktivierbar, durch Ca^{++} und Fluorid aber hemmbar ist.

Außer diesen im Muskel vorkommenden Fermenten wurden im Hirngewebe zwei Gruppen ATP-monophosphatasen gefunden, von denen die eine solche Enzyme umfaßt, die an Zellpartikel gebunden sind, während die andere Gruppe mehr oder minder lösliche Fermente dieser Art enthält. Auch Tumorhomogenate enthalten ein derartiges lösliches Ferment. Weiterhin findet sich ATP-monophosphatase besonders in den Spermatozoen und in der Retina, über ein Vorkommen in Schlangengiften wird berichtet, und MEYERHOF[26] schreibt der ATP-monophosphatase der Hefe große Bedeutung zu.

NOVIKOFF, HECHT, PODLER und RYAN[29] wiesen im Homogenat und in der Mitochondrienfraktion der Rattenleber eine durch Mg^{++}, nicht aber durch Ca^{++} aktivierbare ATPase bei pH 6,8 nach.

Die meisten Phosphatasen werden durch Phosphate, Fluorid, Cystein, Citrate, Oxalate, Tartrate, Cyanide und Ascorbinsäure gehemmt.

Alkalische und saure Phosphatase sowie ATPase im Ovar

1. Gesamtovar

Das Ovar wurde von einer großen Anzahl von Autoren teils auf makroskopisch-chemischem Weg, teils histochemisch

auf seinen Fermentgehalt untersucht. Sämtliche Methoden beruhen im Prinzip auf dem Nachweis der durch das Ferment vom Substrat abgespaltenen Moleküle.

Ähnlich wie CORNER[5] 1948 konnte auch GENESI[9] 1953 auf histochemischem Wege alkalische Phosphatase im Follikel, in der Theca und im Corpus luteum verschiedener Säugetiere nachweisen.

WIMSATT[34] fand 1949 in den Thekazellen und in den Endothelzellen des Corpus luteum der Fledermaus sehr reichlich alkalische Phosphatase, konnte jedoch in den Granulosazellen reifer Follikel keine Phosphatasen nachweisen.

DEANE[6] stellte 1952 bei der Ratte alkalische Phosphatase in der Theca interna, weniger in den Epithelzellen des Corpus luteum und des Interstitiums fest. Es wird besonders auf die Beobachtung hingewiesen, daß sich mit dem Auftreten von Lipoiden auch in der Granulosa atretischer Follikel alkalische Phosphatase finden läßt.

MOSS, WRENN und SYKES[28] wiesen 1954 in Rinderovarien alkalische Phosphatase nach, deren Aktivität mit dem Wachstum des Follikels im Follikelepithel ab- und in den Thekazellen zunimmt. Bei mittleren und größeren Follikeln konnten sie nur noch in den Granulosazellen des Eihügels alkalische Phosphatase feststellen.

ARVY[3] fand 1960 beim Rind alkalische Phosphatase in der Granulosa und besonders im Corpus luteum menstruationis und graviditatis.

Eine ausgezeichnete Studie über die Veränderung der alkalischen Phosphatase während des mensuellen Cyclus liegt von OBER[30] vor. Er konnte nachweisen, daß im Ovar vor allem in den Steroidhormone bildenden Drüsenzellen alkalische Phosphatase vorkommt, so in der Theca interna des wachsenden Follikels und in den Granulosaluteinzellen der Gestationsdrüse. Nach seiner Ansicht ist die alkalische Phosphatase im Ovar an der Überführung von Stoffen aus der Zelle in das Blut und umgekehrt beteiligt.

Wie ALAMANI und MANGIONE[2] an gesunden Ovarien des Menschen feststellten, zeigt die Aktivität der alkalischen Phosphatase eine Abhängigkeit von der Sekretionsfähigkeit des Organs. Sie weisen in diesem Zusammenhang auf die Schwankungen der Fermentaktivität zwischen Kern und Cytoplasma der Theca-interna-Zellen hin. Nach ihren Feststellungen findet man vor allem auch in den Theca-interna-Zellen atretischer Follikel eine hohe Aktivität der alkalischen Phosphatase, was ihrer Ansicht nach einen Hinweis auf die endokrine Aktivität der atretischen Follikel darstellt.

Saure Phosphatase wurde von LOBEL und Mitarbeitern[23] 1961 in atretischen Follikeln und älteren Corpora lutea von Ratten nachgewiesen.

In der uns zugängigen Literatur war eine einzige Angabe über ATPase-Aktivität im Ovar zu finden. ARVY[3] konnte eine grössere ATPase-Aktivität sowohl in Primärfollikeln, atretischen und sprungreifen Follikeln als auch im Corpus luteum aller Stadien feststellen.

2. Liquor folliculi

Hierzu sei vor allem auf die Untersuchungen von JUNG und HELD[15] verwiesen, die für die alkalische Phosphatase einen mittleren Stundenwert von 21 γ P/ml Follikelflüssigkeit ergaben, für die saure Phosphatase 31 γ P/ml/Std. im Mittel. Sehr interessant erscheint die Beobachtung, daß bei den Phosphatasen wie bei den Proteinasen die Follikelflüssigkeit der großen, reifen Follikel eine erheblich niedrigere Fermenttätigkeit zeigte als die der kleinen Follikel.

In derselben Arbeit untersuchte Flüssigkeit aus Cysten des menschlichen und Schweineovars führte zu negativen Ergebnissen.

Über ATPase-Aktivität in der Follikelflüssigkeit stehen uns keine Literaturangaben zur Verfügung.

3. Corpus luteum

Wie schon im Abschnitt über das Gesamtovar erwähnt, wird von WIMSATT[34] alkalische Phosphatase im Corpus luteum der Fledermaus beschrieben. Die von DEANE[6] gefundene alkalische Phosphatase wurde ebenfalls schon dort aufgeführt.

JUNG und A. KIDESS[16] bestimmten die Aktivität der alkalischen Phosphatase im Corpus luteum des Schweineovars mit einem Mittelwert von 60 γ P/mg N/Std., die Aktivität der sauren Phosphatase mit einem Stundenwert von 145 γ P/mg N im Mittel. Die Aktivität der sauren Phosphatase beträgt demnach etwa das 2,5fache der Aktivität der alkalischen Phosphatase.

Beim Menschen konnte JUNG[14] im Corpus luteum graviditatis die

beiden Phosphatasen nachweisen. Überraschenderweise liegt die Aktivität sowohl der alkalischen als auch der sauren Phosphatase im Schwangerschaftsgelbkörper höher als im Corpus luteum des Schweines. Außerdem überwiegt die Aktivität der alkalischen Phosphatase mit 376 γ P/mg N/Std. über die der sauren Phosphatase mit 201 γ P/mg N/Std.

Auf das von ARVY[3] festgestellte Vorkommen der alkalischen Phosphatase im Corpus luteum menstruationis und graviditatis des Rindes sowie der ATPase in Corpora lutea aller Stadien wurde bereits hingewiesen.

4. Corpus rubrum

Über Phosphatasen im Corpus rubrum konnten keine Angaben gefunden werden.

5. Phosphatasen in Geschwülsten

MOSCHINO und PARISOTTO[27] berichten über die alkalische Phosphatase bei der menschlichen Ovarialgeschwulst. Die von ihnen gemessenen Serumphosphatasewerte waren gegenüber den Kontrollfällen mit 6,3 vor der Operation bis 15,7 erhöht, beim soliden Carcinom sogar bis 19,3. Nach der Operation fielen die Werte in der Mehrzahl der Fälle wieder ab.

Nach LETTERER[22] kommt tierischem und menschlichem Carcinom- und Sarkomgewebe wie allen wachsenden Geweben die Fähigkeit zu, aus Nucleinsäuren Phosphorsäure abzuspalten. LETTERER weist in diesem Zusammenhang auf eine durch Mg^{++} aktivierbare saure Phosphatase hin, die bei Prostatacarcinom im Serum und in den Organen von Erkrankten vermehrt gefunden wird.

MALINOU und REYNOLDS[25] stellten hinsichtlich Aktivität, pH-Optimum und Hemmung der sauren Phosphatase durch Cu^{++}, F^{-} und Tartrat einen Vergleich zwischen einem chemisch induzierten Spindelzellsarkom des Hamsters (Lutz-Tumor) und einem spontan aufgetretenen Carcinosarkom der Ratte (Walker 256) an und konnten zwischen beiden Tumoren keine Unterschiede der geprüften Eigenschaften feststellen.

B. EXPERIMENTELLER TEIL

I. Methodik

1. Herstellung der Homogenate und Gewinnung der Zellfraktionen

Die menschlichen Ovarien wurden unmittelbar nach der Operation aufgearbeitet, in seltenen Fällen zuvor wenige Tage in der Kühltruhe eingefroren.

Die untersuchten Schweineovarien entnahmen wir frisch geschlachteten Schweinen und verarbeiteten sie so rasch wie möglich unter dauernder Eiskühlung. Zunächst punktierten wir mit Hilfe einer an die Wasserstrahlpumpe angeschlossenen Kanüle die Follikel, getrennt nach kleinen, mittleren und großen Follikeln. Anschließend mischten wir gleiche Teile dieser drei Flüssigkeiten, um so zusätzlich einen Durchschnittswert aus sämtlichen Follikelgrößen zu erhalten. Die gemessenen pH-Werte des Liquor folliculi variieren zwischen 7,2 und 7,5, wobei offenbar der Flüs-

sigkeit der kleinen Follikel die höheren, derjenigen der großen Follikel die niedrigeren pH-Werte zugeordnet werden müssen.

Als nächster Schritt wurden die Corpora lutea und rubra mit der Schere herausgeschnitten, von der Bindegewebskapsel befreit und nach den Angaben von LANG und SIEBERT[21] aufgearbeitet. Sie wurden möglichst fein zerschnitten. Nach Zusatz von 2 bzw. 3 Teilen 30%iger Rohrzuckerlösung oder - wenn nicht fraktioniert werden konnte und gleichzeitig Dipeptidasen zu bestimmen waren - 1%iger KCl-Lösung wurde das Gewebe im Glashomogenisator nach POTTER-ELVEHJEM weiter zerkleinert und schließlich noch durch ein dichtes Tuch gepreßt. Das so entstandene Homogenat enthält alle, allerdings aus dem Zellverband herausgelösten Zellbestandteile. JUNG und E. KIDESS[17] konnten vereinzelt noch intakte Zellen im Zellkernausstrich des Homogenats feststellen.

Das Gesamtovar und die menschlichen Ovarialtumoren wurden auf dieselbe Weise aufgearbeitet, nachdem vorhandene Follikel - bei Schweineovarien stets eine große Anzahl - so weit wie möglich abpunktiert worden waren.

An einem kleinen Teil des gewonnenen Homogenats führten wir unmittelbar Fermentbestimmungen durch, den Rest verwendeten wir zur Extraktion der Zellfraktionen nach der Methode von HOGEBOOM, SCHNEIDER und PALADE[11]. Das mit 3 Volumteilen 30%iger Rohrzuckerlösung verdünnte Homogenat wurde 10 min. bei 600 g/min. zentrifugiert. Hierdurch konnten wir die Zellkerne sedimentieren. Daran anschließend schwemmten wir die Kerne (K_3) zweimal in 30%iger Rohrzuckerlösung auf und zentrifugierten

sie nochmals je 10 min. bei 600 g/min. ("Waschen" der Zellkerne). Den Überstand ($Ü_1$) schleuderten wir nun zur Gewinnung der Mitochondrienfraktion 30 min. bei 24 000 g/min. in einer gekühlten Zentrifuge. Die hierbei als Überstand ($Ü_2$) zurückbleibende Cytoplasmafraktion enthält noch die Microsomen.

2. Bestimmung der Fermentaktivität

a) Alkalische Phosphatase

Die Aktivität der alkalischen Phosphatase bestimmten wir nach der Methode von JENNER und KAY[13]. Hierbei wird Na_2-β-Glycerophosphat als Substrat verwendet und in dem durch die Fermentlösung freigesetzten Phosphat Phosphor quantitativ nachgewiesen. Die Bestimmung des anorganischen Phosphors erfolgte hier wie bei den beiden nachfolgenden Fermenten nach dem von LOHMANN und JENDRASSIK[24] aufgezeigten Verfahren.

Reagenzien:

1) Stammlösung: 2,5 g Na_2-β-Glycerophosphat wurden in 100 ml Aqua destillata gelöst.

2) Puffer: 0,2 m Glycocoll-NaOH-Puffer pH 9,0.

3) Die Substrat-Puffer-Lösung aus 1 Teil Stammlösung und 5 Teilen Puffer muß vor jedem Ansatz frisch hergestellt werden.

4) Als Fermentlösung verwendeten wir die zu untersuchenden 25- bzw. 33,3%igen bindegewebsfreien Homogenate in Verdünnungen von 1 ml ad 5 - 10 ml mit physiologischer NaCl - Lösung, mit dem Ziel, einen linearen Reaktionsverlauf zu

erhalten. Die Verdünnungen der Zellfraktionen sind bei den einzelnen Versuchen angegeben.

5) Die Unterbrechung der Fermentreaktion erfolgte mit 15%iger Trichloressigsäure (TCE).

Das Versuchsschema kann folgendermaßen skizziert werden:

5 ml Substrat-Puffer-Lösung

je 15 min. bei 37°C praeinkubiert

1 ml Fermentlösung

Inkubation bei 37°C im Wasserbad

2 ml 15%ige TCE

Als Inkubationszeiten wurden 0, 30 und 45 min. gewählt. Dem Null-Minuten-Wert wurde schon vor Zugabe der Fermentlösung TCE zugesetzt.

b) Saure Phosphatase

Die Aktivität der sauren Phosphatase wurde nach der von HUDSON und LONDON[12] angegebenen Methode bestimmt, deren Grundgedanke derselbe ist wie beim Nachweis der alkalischen Phosphatase. Auch hierbei ist das Substrat eine Na_2-β-Glycerophosphatlösung.

Reagenzien:

1) Substrat-Puffer-Lösung: 410 mg $MgCl_2 + 6\ H_2O$ und 500 mg Na_2-β-Glycerophosphat wurden in Aqua destillata gelöst und 80 ml 0,2 m Acetatpuffer pH 5,0 dazugegeben. Mit Aqua destillata wurde auf 100 ml aufgefüllt.

2) Als Fermentlösung verwendeten wir die zu untersuchenden Gewebsextrakte in denselben Verdünnungen wie bei der alkalischen Phosphatase.

3) Die Unterbrechung der Fermentreaktion geschah mit 30%iger Trichloressigsäure.

Im einzelnen sah der Fermentansatz wie folgt aus:

4 ml Substratpuffer

je 15 min. bei 37°C inkubiert

1 ml Fermentlösung

Inkubation bei 37°C im Wasserbad

1 ml 30%ige TCE

Die Inkubationszeiten betrugen 0, 30 und 45 min.

c) Adenosintriphosphatase (ATPase)

Die ATPase-Aktivität wurde nach der Methode von PERRY[31] bestimmt.

Reagenzien:

1) Substrat: 0,05 m 5'-ATP · Na_2H · 3 H_2O
0,1 m $CaCl_2$

2) Puffer: 0,2 m Glycocoll-NaOH-Puffer pH 9,1

3) Als Fermentlösung verwendeten wir die 25- und 33,3%igen Gewebsextrakte in Verdünnungen von 1 ml ad 2 - 5 ml mit physiologischer NaCl-Lösung, den Liquor folliculi verdünnten wir 1 ml ad 2 - 3 ml. Die Verdünnungen der Zellfraktionen sind bei den einzelnen Versuchen angegeben.

4) Die Fermentreaktion wurde mit 15%iger Trichloressigsäure unterbrochen.

Der Versuch wurde wie folgt angesetzt:

1 ml Puffer pH 9,1	
0,2 ml $CaCl_2$	gemeinsam 5 min. bei
0,3 ml ATP	25°C praeinkubiert
0,3 ml Aqua destillata	
0,2 ml Fermentlösung	5 min. bei 25°C praeinkubiert

Inkubation bei 25°C im Wasserbad

1 ml 15%ige TCE

Die Inkubationszeiten betrugen 0, 20 und 45 min.

Im Laufe der Versuchsarbeiten stellte sich heraus, daß das Substrat bei der colorimetrischen Phosphorbestimmung auch ohne Fermentzusatz einen beachtlichen Gehalt an anorganischem Phosphor aufweist, der auffallenderweise mit steigender Inkubationszeit abnimmt. Der Null-Minuten-Wert liegt daher außerordentlich hoch, der 20- und insbesondere der 45-Minuten-Wert erschienen zunächst relativ niedrig, ja der Zuwachs der Extinktion gegenüber derjenigen des Null-Minuten-Wertes fiel bei kleineren Fermentaktivitäten sogar negativ aus. Um ein Bild über die echte Fermentaktivität zu bekommen, wurde von nun an in jeder Versuchsreihe ein Substratleerwert mitbestimmt, dessen Ansatz sich nur dadurch von den Fermentansätzen unterschied, daß wir anstelle der Fermentlösung 0,2 ml Aqua destillata hinzufügten (s. hierzu Abb. 1).

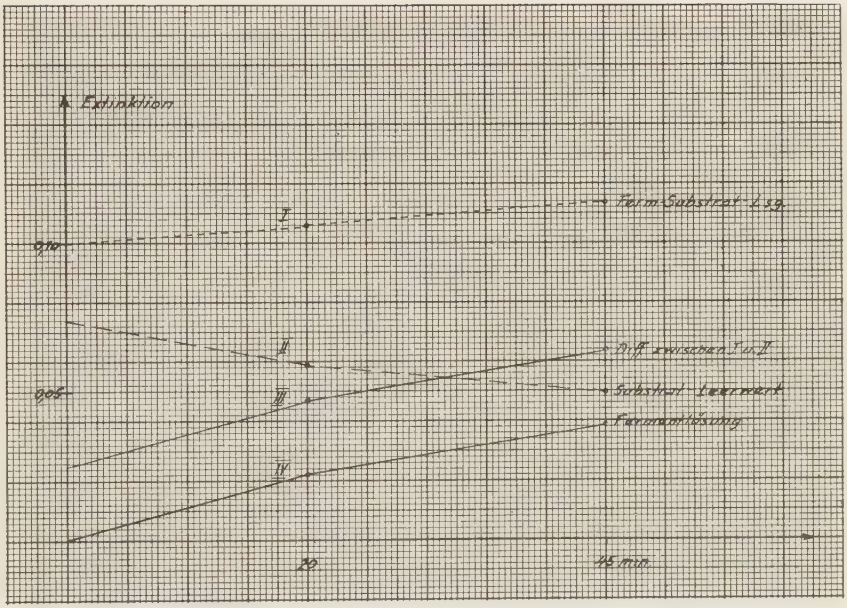

Abb. 1: Einfluß des Substratleerwertes auf die Ermittlung des durch ATPase freigesetzten Phosphats

3. Colorimetrische Phosphorbestimmung

Bei allen drei Fermenten bestimmten wir die Menge des freigesetzten anorganischen Phosphats nach einer von LOHMANN und JENDRASSIK[24] in Anlehnung an FISKE and SUBBAROW[7] ausgearbeiteten Methode.

Benutzte Lösungen:

1) 2,5%ige Ammoniummolybdatlösung in 5 n H_2SO_4
2) Amidollösung, die nach Vorschrift bereitet wurde.

Ausführung der colorimetrischen Bestimmung:

In 25-ml-Meßkölbchen wurden 5 ml Ammoniummolybdat, 2 ml Filtrat des mit TCE enteiweißten Fermentansatzes und 1 ml Amidollösung einpipettiert. Der Phosphornachweis beruht auf der Beobachtung, daß in einem Gemisch von Molybdänsäure und Phosphormolybdänsäure nur die letztere durch Reduktionsmittel, hier durch Amidollösung, zu Molybdänblau reduziert wird. Um in allen Proben einen für etwa 1 Stunde nahezu konstant bleibenden Farbton zu erhalten, wurden sämtliche Versuchslösungen gleichzeitig 7 min. im Wasserbad auf 37°C erwärmt und anschließend - ebenfalls gleichzeitig - 7 min. in Wasser mit 20°C abgekühlt. Nun konnten wir die aufgetretene blaue Farbe im Colorimeter Elko II mit Filter J 61,7 55 gegen einen Leerwert (Ammoniummolybdat, Amidollösung und Aqua destillata, ohne Filtrat) als Extinktion ablesen. Aus der Eichkurve ergaben sich die zugehörigen Phosphorwerte.

Eichkurve:

Zur Herstellung einer Eichkurve wurden 0,4390 g trockenes KH_2PO_4 in 1 l Aqua destillata aufgelöst. Diese 10 mg%ige Phosphorlösung wurde weiterverdünnt auf 100, 90, 80, ... 10 γ P/ml.

Durch Messung dieser Standardlösungen verschiedener Konzentration ergab sich nachstehende Eichkurve.

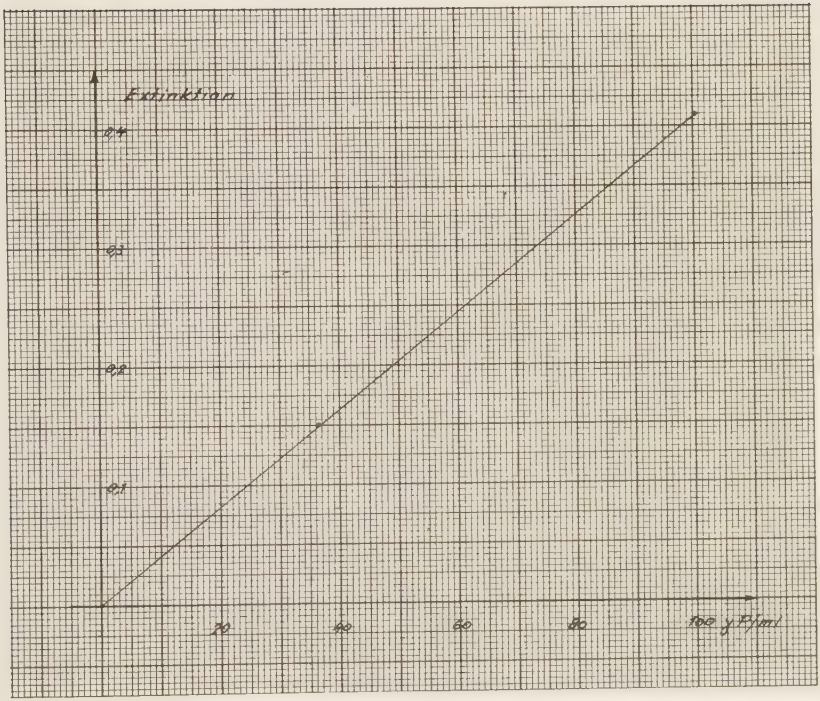

Abb. 2: Eichkurve für Phosphatasebestimmung

II. Ergebnisse

Um die Fermentaktivität der verschiedenen untersuchten Gewebsextrakte und Zellfraktionen vergleichen zu können, legten wir den Stickstoffgehalt pro ml Fermentlösung als Bezugsgröße fest. Der Stickstoffgehalt wurde nach dem Mikro-KJELDAHL-Verfahren ermittelt.

Bei der Umrechnung der Fermentaktivität auf den Stundenwert gingen wir für die saure und alkalische Phosphatase vom 30-Minuten-Wert, für die ATPase vom 20-Minuten-Wert aus.

Zu den Versuchen, bei denen die uns zur Verfügung stehenden Gewebemengen ausreichten, um eine Zellfraktionierung vorzunehmen, stellten wir eine Stickstoff- und Fermentaktivitätsbilanz auf. Die angegebenen Stundenwerte sind hierfür auf 1 ml Homogenat als Bezugsgröße umgerechnet. Aus einer solchen Bilanz ist ersichtlich, ob durch die einzelnen Manipulationen nicht etwa größere Aktivitätsverluste eingetreten sind. Auf Grund der bisherigen Erfahrungen muß eine Fehlerbreite von etwa 5 % bei den Versuchen berücksichtigt werden.

An dieser Stelle möchte ich Fräulein Christiane Wiedemann für die wertvolle technische Unterstützung herzlich danken.

1. Untersuchungen an menschlichen Ovarien

a) Gesamtovar und besondere Befunde

Alter d. Pat.	Fermentaktivität γ P/mg N/Std.			Menstruation, Cyclustag bei Operation
	alk. Pase	saure Pase	ATPase	
51 J.	-	-	210	recid. Blutgen.
41 J.	27	19	Aktiv. nachgew.	regelmäßig, 24. Tag
51 J.	89	108	-	regelmäßig, 18. Tag
52 J.	52	100	-	unregelm., 16. Tag
50 J.	-	-	217	unregelm., 22. Tag
44 J.	9	27	147	regelm., Prolif. - Endometr.
47 J.	13	43	140	unregelm., Prolif. - Endometr.
47 J.	19	16	172	regelm., 15. Tag
42 J.	14	22	158	früh. Prol. -Endom.
51 J.	0	24	220	Menopause
54 J.	18	45	164	Menopause

Tab. 1: Phosphatase-Aktivität bei klimakterischen und praeklimakterischen Ovarien sowie bei Ovarien in der Menopause

1) Klimakterische und praeklimakterische Ovarien

Wie die erste Gruppe der in Tabelle 1 aufgeführten Versuche zeigt, liegt die Aktivität der alkalischen Phosphatase zwar in zwei Fällen über derjenigen der sauren Phosphatase, in allen übrigen untersuchten klimakterischen und praeklimakterischen Ovarien ist sie jedoch deutlich niedriger als jene, wie auch die

in Tabelle 3 (s.S.24) errechneten Mittelwerte ungefähr eine doppelt so hohe Aktivität der sauren gegenüber der alkalischen Phosphatase erkennen lassen.

Die große Schwankungsbreite der Einzelwerte der alkalischen und sauren Phosphatase führt zwangsläufig zu der Überlegung, ob nicht etwa eine direkte Abhängigkeit vom jeweiligen Funktionszustand des Ovars bestehe. Um einen besseren Überblick zu bekommen, wurden die Werte, zu denen auf Grund der Regelanamnese oder anhand des histologischen Befundes der Uterusschleimhaut der ovarielle Funktionszustand angegeben werden kann, in ein Koordinatensystem eingetragen (s.Abb. 3).

Die Kurven dürfen insofern nicht als kontinuierlich betrachtet werden, als sie das Ergebnis von Einzelmessungen an verschiedenen Ovarien darstellen. Trotzdem könnte aus dieser graphischen Darstellung abgelesen werden, daß die Aktivität der alkalischen und sauren Phosphatase um die Zeit des Follikelsprungs ihr Maximum hat.

Hingegen läßt die an sich schon hohe ATPase-Aktivität keinen deutlichen Gipfel erkennen. Immerhin scheint sie im Laufe der Proliferationsphase und auch noch in der ersten Hälfte der Sekretionsphase weiter anzusteigen.

2) Ovarien in der Menopause

In beiden untersuchten Fällen weist die Fermentaktivität keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den klimakterischen und praeklimakterischen Ovarien auf.

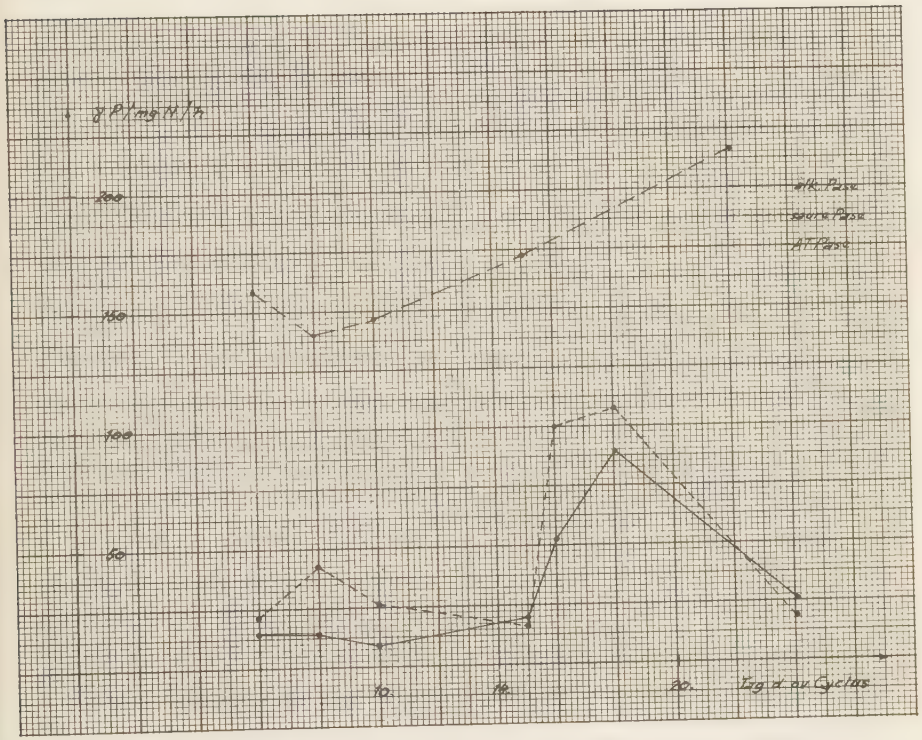

Abb. 3: Aktivität der alkalischen und sauren Phosphatase sowie der ATPase einiger klimakterischer und praeklimakterischer Ovarien, die sich in verschiedenem Funktionszustand befanden

3) Ovarialcarcinom

Die Versuche weisen auf eine gesteigerte Aktivität der alkalischen und sauren Phosphatase hin; insbesondere erscheint die alkalische Phosphatase im Vergleich mit Ovarien ohne pathologischen Befund stark vermehrt. Dagegen liegen die ATPase-Werte im Rahmen der Schwankungsbreite der in Tabelle 1 aufgeführten Ergebnisse. Der einzige augenfällig erhöhte Wert rührt von einem weit ausgedehnten Adeno-Carcinom her.

Alter d. Pat.	Fermentaktivität γ P/mg N/Std.			Menstruation, Cyclustag bei Operation
	alk. Pase	saure Pase	ATPase	
56 J.	56	83	250	Menopause
28 J.	227	59	240	regelmäßig, 28. Tag
46 J.	35	56	-	unregel., 30. Tag
61 J.	96	49	120	Menopause
49 J.	121	111	354	Amenorrhoe
	Ovar bei Adeno-Ca. corporis uteri			
36 J.	71	40	0	regelmäßig, 26. Tag

Tab. 2: Phosphatase-Aktivität im Ovarialcarcinom und Ovar bei Adeno-Ca. corporis uteri

In der folgenden Übersicht wurde die Fermenttätigkeit der klimakterischen und praeklimakterischen Ovarien sowie der Ovarien in der Menopause einerseits und im Ovarialcarcinom andererseits verglichen.

Ferment	Fermentaktivität γ P/mg N/Std.	
	Ov. ohne path. Bef.	Ovarial - Ca.
alkal. Pase	14 ± 8 (7 Versuche)	107 ± 75 (5 Versuche)
saure Pase	28 ± 11 (7 Versuche)	72 ± 26 (5 Versuche)
ATPase	179 ± 43 (8 Versuche)	203 ± 72 (3 Versuche)

Tab. 3: Fermentaktivität bei Ovarien ohne pathologischen Befund und beim Ovarialcarcinom (Mittelwerte)

In Tabelle 3 wurden zur Errechnung der mittleren Aktivität der alkalischen und sauren Phosphatase nur die Werte herangezogen, die offenbar ein Maß für die "normale" Fermentaktivität darstellen; die auf einen nicht vergleichbaren Funktionszustand des Ovars zurückzuführenden, erhöhten Werte wurden außer Acht gelassen.

Anhand der t-Verteilung nach KOLLER läßt sich für die alkalische Phosphatase im nicht pathologisch veränderten Ovar und im Ovarial-Carcinom eine statistische Sicherheit von 99 % errechnen, bei der sauren Phosphatase beträgt sie 99,7 %; die Erhöhung beim Carcinom ist demnach signifikant.

Im Gegensatz hierzu liegt die statistische Sicherheit der beiden zu vergleichenden Gruppen bei der ATPase unter 50 %. Die geringfügige Erhöhung der ATPase-Aktivität beim Carcinom kann also nicht als signifikant angesprochen werden.

4) Ovar bei Adeno-Carcinom corporis uteri

Aus dem einzigen vorliegenden Versuchsergebnis (s. Tab. 2, S. 24) können keine sicheren Schlüsse gezogen werden. Allerdings erscheint die hierbei gemessene Aktivität der alkalischen Phosphatase auch deutlich erhöht, wenn man berücksichtigt, daß sich das Ovar in einem dem Ende der Sekretionsphase entsprechenden Funktionszustand befand.

5) Verschiedene Befunde

Sowohl beim Uterusgewebe bei intramuralem Solitärmyom als auch beim Ovar mit Luteincysten, bei dem nicht mit Endoxan behandelten Granulosazelltumor, dem kleincystisch degenerierten Ovar und dem Schwangerschaftsovar fällt eine relativ geringe

Alter d. Pat.	Fermentaktivität γP/mg N/Std.			Menstruation, Cyclustag bei Operation
	alk. Pase	saure Pase	ATPase	
	Uterusgewebe bei intramuralem Solitärmyom			
41 J.	20	33	74	regelmäßig, 10. Tag
	Luteincysten des Ovars bei Blasenmole			
38 J.	45	21	43	Schwangerschafts-Amenorrhoe
	Kleincystisch degeneriertes Ovar			
33 J.	19	31	Aktiv. nachgew.	abgeblut. Prol.-Endometrium
	Schwangerschaftsovar (LM II) bei Ca. colli			
42 J.	64	14	Aktiv. nachgew.	Schwangerschafts-Amenorrhoe
	Granulosazelltumor - nicht Endoxan-behandelt			
53 J.	17	89	77	Menopause
	Granulosazelltumor - Endoxan-behandelt			
48 J.	174	186	-	Menopause

Tab. 4: Phosphatase-Aktivität bei verschiedenen besonderen Befunden

ATPase-Aktivität auf. Beim untersuchten Schwangerschaftsovar ist die alkalische Phosphatase vermehrt.

Interessant erscheint ein Vergleich der Ergebnisse der beiden Granulosazelltumoren. Während bei dem nicht Endoxan-behandelten Tumor lediglich die saure Phosphatase etwas erhöht ist, fällt bei der mit dem Cytostaticum behandelten Geschwulst eine stark erhöhte Aktivität der sauren und besonders der alkalischen Phosphatase auf.

b) Corpus luteum

Alter d. Pat.	Fermentaktivität γP/mg N/Std.			Cyclustag
	alk. Pase	saure Pase	ATPase	
42 J.	-	-	100	24. Tag
42 J.	128	138	201	23. Tag
42 J.	95	60	228	frühe Prol.-Phase

Tab. 5: Phosphatase-Aktivität im Corpus luteum menstruationis

Wir konnten an zwei Corpora lutea menstruationis alkalische und saure Phosphatase bestimmen. Beim ersten handelt es sich um ein Corpus luteum "in Blüte" am 23. Tag des mensuellen Cyclus. Die alkalische Phosphatase ist hier gegenüber dem Mittelwert aus mehreren Versuchen am klimakterischen und praeklimakterischen Gesamtovar fast auf das 9fache erhöht, die saure Phosphatase auf etwa das 5fache.

Bei einem älteren Corpus luteum, das in den ersten Tagen des seiner Entstehung folgenden Cyclus operativ entfernt wurde, konnten wir zwar keine so starke Erhöhung der Aktivität der sauren Phosphatase messen, jedoch eine absolut und relativ, d.h. auch gegenüber der sauren Phosphatase vermehrte Aktivität der alkalischen Phosphatase.

Hinsichtlich des ATPase-Gehaltes ließ das Corpus luteum keinen faßbaren Unterschied gegenüber dem Gesamtovar erkennen. Der Mittelwert aus 3 Versuchen liegt bei 180 γ P/mg N/Std.

2. Untersuchungen an Schweineovarien

Gewebe	ATPase-Aktivität γ P/mg N/Std.	N-Werte mg/ml Hom.
a) Gesamtovar		
1) mit kleinen Foll.	480	3,444
2) mit Corpus luteum und Corpus rubrum	321	3,472
b) Corpus luteum	281	2,016 - 3,480
c) Corpus rubrum	147	5,166
d) Follikelflüssigkeit		
1) aus kleinen Foll. pH 7,5	101	8,904
2) aus allen Größen pH 7,45	64	10,002
3) aus mittleren Foll. pH 7,3	55	12,768
4) aus großen Foll. pH 7,2	27	14,891

Tab. 6: ATPase-Aktivität des Schweineovars
- Mittelwerte aus 3 Versuchsserien -

Beim Schweineovar müssen wir hinsichtlich des Funktionszustandes verschiedene Gruppen unterscheiden. Jungen Tieren entnommene Ovarien enthielten zahlreiche kleine und kleinste Follikel (Gruppe 1), von älteren Tieren stammende Ovarien ließen Corpora lutea, Corpora rubra und Follikel aller Größen erkennen. Diese 2. Gruppe dürfte dem menschlichen Ovar am ehesten entsprechen. Ihre ATPase-Aktivität liegt unter derjenigen, die wir bei den Ovarien der jungen Tieren messen konnten.

Das Gesamtovar des Schweines zeigt die höchste, im Rahmen

dieser Arbeit gefundene ATPase-Aktivität.

Auffallend ist, daß im Gegensatz zu den menschlichen Ovarien das Corpus luteum und Corpus rubrum weniger aktiv sind als das Gesamtovar. Der Unterschied ist allerdings nicht so groß, wenn wir zum Vergleich die 2. Gruppe der Gesamtovarien heranziehen, was insofern gerechtfertigt oder vielleicht sogar notwendig erscheint, als wir beim Menschen - wie bereits oben erwähnt - im Gesamtovar auch die verschiedensten Stadien der funktionellen Einheiten miterfassen.

Die Follikelflüssigkeit zeigt die niedrigste Aktivität unter den Anteilen des Ovars. Dabei ist interessant, daß der Fermentgehalt bei zunehmender Follikelgröße stark absinkt. Die ATPase-Aktivität der abpunktierten Flüssigkeit beträgt bei den größten Follikeln noch etwa 25 % der Aktivität der kleinen Follikel.

3. Intrazelluläre Verteilung der Aktivität der alkalischen und sauren Phosphatase sowie der ATPase

a) Alkalische und saure Phosphatase

Es folgen vier Aufstellungen über die intrazelluläre Verteilung des Stickstoffs und der Aktivität der alkalischen und sauren Phosphatase bei einigen Ovarialtumoren. Wie schon frühere Untersuchungen über die Verteilung der alkalischen und sauren Phosphatase in der Zelle zeigten, muß der Hauptfermentgehalt der Cytoplasma- und Microsomenfraktion zugeschrieben werden. In Versuch 2 trennten wir mit Hilfe einer Ultrazentrifuge die Microsomen vom Cytoplasma ab und fanden in der Microsomenfraktion 36,2 %, in der Cytoplasmafraktion 33,3 % der sauren Phosphatase, hingegen von der alkalischen Phosphatase nur 18,9 % in den Microsomen und 71,2 % im Cytoplasma.

1. Versuch: 61-jährige Patientin mit papillärem Adeno-Ca.

21,5 g Gewebe wurden mit 43 ml 30%iger Rohrzuckerlösung homogenisiert. Von den hieraus gewonnenen 42 ml Homogenat wurden 32 ml zur Extraktion der Zellfraktionen verwendet (K_3 1 ml ad 15 ml, Mit. 1 ml ad 10 ml verdünnt).

Zellfraktion	N-Gehalt		Phosphatase-Aktivität pH 9,0		pH 5,0	
	mg/ml Homogenat	%	γ P/ml Hom./Std.	%	γ P/ml Hom./Std.	%
33,3%iges Homogenat	4,208	100,0	340	100,0	175	100,0
Daraus gewonnen:						
Zellkerne	0,249	6,0	0	0	2	1,1
Mitochondrien	0,339	8,2	25	7,4	17	9,8
Cytoplasma + Microsomen	3,628	86,4	213	62,7	142	81,1
	4,216	100,5	238	70,1	161	92,0

Tab. 7: Intrazelluläre Verteilung des Gesamtstickstoffs und der Gesamtaktivität der alkalischen und sauren Phosphatase bei Carcinomgewebe des menschlichen Ovars

Der Phosphatasegehalt der Kernfraktion ist, außer bei dem carcinomatös entarteten papillären Kystom (s. Versuch 2) sehr gering. Dagegen ist die Fermentaktivität der Mitochondrien größer als ihr Anteil am Gesamtstickstoff der Zelle. Insbesondere gilt dies für das Ovar mit Luteincysten bei Blasenmole.

2. Versuch: 28-jährige Patientin mit doppelseitig carcinomatös entartetem papillären Kystom (Operation erfolgte am 28. Cyclustag).

50 g Gewebe wurden mit 100 ml 30%iger Rohrzukkerlösung homogenisiert und ergaben 108 ml Homogenat. Hiervon wurden 75 ml zur Extraktion der Zellfraktionen verwendet (K_3 1 ml ad 50 ml aus 75 ml Homogenat, Mit. 1 ml ad 25 ml aus 50 ml Homogenat, Mic. 1 ml ad 25 ml aus 25 ml Homogenat).

Zellfraktion	N-Gehalt		Phosphatase-Aktivität pH 9,0		pH 5,0	
	mg/ml Homogenat	%	γP/ml Hom./Std.	%	γP/ml Hom./Std.	%
33,3%iges Homogenat	2,310	100,0	397	100,0	138	100,0
Daraus gewonnen:						
Zellkerne	0,165	7,2	20	5,1	23	16,7
Mitochondrien	0,144	6,2	17	4,3	19	13,8
Microsomen	0,088	3,8	75	18,9	50	36,2
Cytoplasma	1,995	86,3	282	71,2	46	33,3
	2,392	103,5	394	99,5	138	100,0

Tab. 8: Intrazelluläre Verteilung des Gesamtstickstoffs und der Gesamtaktivität der alkalischen und sauren Phosphatase bei Carcinomgewebe des menschlichen Ovars

Die Microsomen zeigen besonders, wenn wir ihren Anteil am Stickstoffgehalt der Zelle mit nur 3,8 % berücksichtigen, eine hohe Phosphataseaktivität.

3. Versuch: 53-jährige Patientin mit Granulosazelltumor, ausgehend vom linken Ovar, nicht Endoxan-behandelt

24,5 g Gewebe wurden mit 73,5 ml 30%iger Rohrzuckerlösung homogenisiert und ergaben 64 ml Homogenat. Hiervon wurden 51 ml zur Extraktion der Zellfraktionen verwendet (K_3 1 ml ad 50 ml aus 51 ml, Mit. 1 ml ad 10 ml aus 25 ml Homogenat).

Zellfraktion	N-Gehalt		Phosphatase-Aktivität pH 9,0		pH 5,0	
	mg/ml Homogenat	%	γP/ml Hom./Std.	%	γP/ml Hom./Std.	%
25%iges Homogenat	5,740	100,0	98	100,0	518	100,0
Daraus gewonnen:						
Zellkerne	1,450	25,5	4	4,1	21	4,1
Mitochondrien	0,810	14,1	22	22,5	71	13,6
Cytoplasma + Microsomen	3,070	53,5	78	79,4	435	84,0
	5,330	93,1	104	106,0	527	101,7

Tab. 9: Intrazelluläre Verteilung des Gesamtstickstoffs und der Gesamtaktivität der alkalischen und sauren Phosphatase bei Granulosazelltumor des menschlichen Ovars

4. Versuch: 38-jährige Patientin mit Luteincysten des Ovars bei Blasenmole (Schwangerschaftsamenorrhoe)

83,5 g Gewebe wurden mit 167 ml 30%iger Rohrzuckerlösung homogenisiert und ergaben 248 ml Homogenat. Hiervon wurden 100 ml zur Extraktion der Zellfraktionen verwendet (K_3 1 ml ad 100 ml aus 100 ml, Mit. 1 ml ad 10 ml aus 25 ml Homogenat).

	N-Gehalt		Phosphatase-Aktivität pH 9,0		pH 5,0	
Zellfraktion	mg/ml Homogenat	%	γ P/ml Hom./Std.	%	γ P/ml Hom./Std.	%
33,3%iges Homogenat	4,785	100,0	195	100,0	90	100,0
Daraus gewonnen:						
Zellkerne	0,184	4,0	7	3,6	3	3,3
Mitochondrien	0,232	4,9	20	10,3	18	20,0
Cytoplasma + Microsomen	4,568	95,6	78	40,1	60	66,7
	4,984	104,5	105	54,0	81	90,0

Tab.10: Intrazelluläre Verteilung des Gesamtstickstoffs und der Gesamtaktivität der alkalischen und sauren Phosphatase bei einem menschlichen Ovar mit Luteincysten bei Blasenmole

b) ATPase

5. Versuch: 61-jährige Patientin mit papillärem Adeno-Ca.

21,5 g Gewebe wurden mit 43 ml 30%iger Rohrzuckerlösung homogenisiert. Von den hieraus gewonnenen 42 ml Homogenat wurden 32 ml zur Extraktion der Zellfraktionen verwendet (K_3 1 ml ad 15 ml, Mit. 1 ml ad 10 ml aus 32 ml Hom.)

Zellfraktion	N-Gehalt		ATPase-Aktivität	
	mg/ml Homogenat	%	γP/ml Hom./Std.	%
33,3%iges Homogenat	4,208	100,0	437	100,0
Daraus gewonnen:				
Zellkerne	0,249	6,0	28	6,4
Mitochondrien	0,339	8,2	57	13,1
Cytoplasma + Microsomen	3,628	86,4	348	79,5
	4,216	100,5	433	99,0

Tab. 11: Intrazelluläre Verteilung des Gesamtstickstoffs und der Gesamt-ATPase-Aktivität bei Carcinomgewebe des menschlichen Ovars

Auch die ATPase ist vorwiegend in den Microsomen und im Cytoplasma lokalisiert (s. hierzu Abb. 4). Sowohl bei den menschlichen Ovarialcarcinomen als auch beim Gesamtovar und Corpus luteum vom Schwein (Tab. 15 u. 16) ist der Anteil der ATPase-

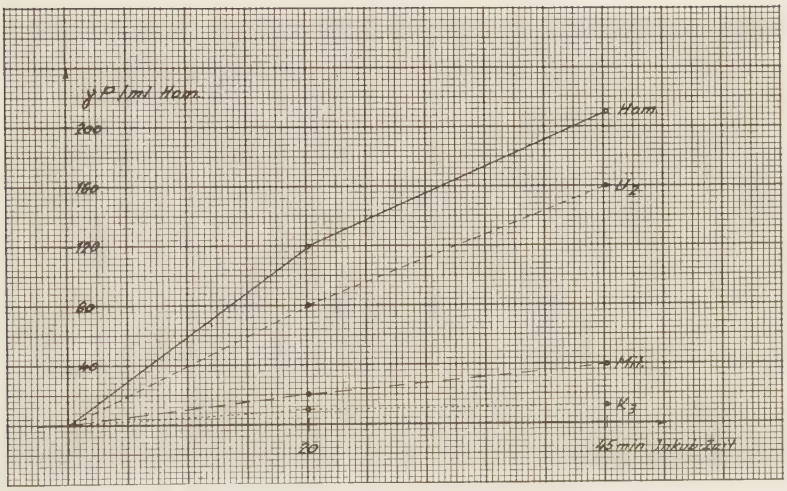

Abb. 4: Reaktionskurven des 33,3%igen Homogenats und der Zellfraktionen aus Versuch 5
- ATPase-Aktivität in γ P/ml Homogenat -

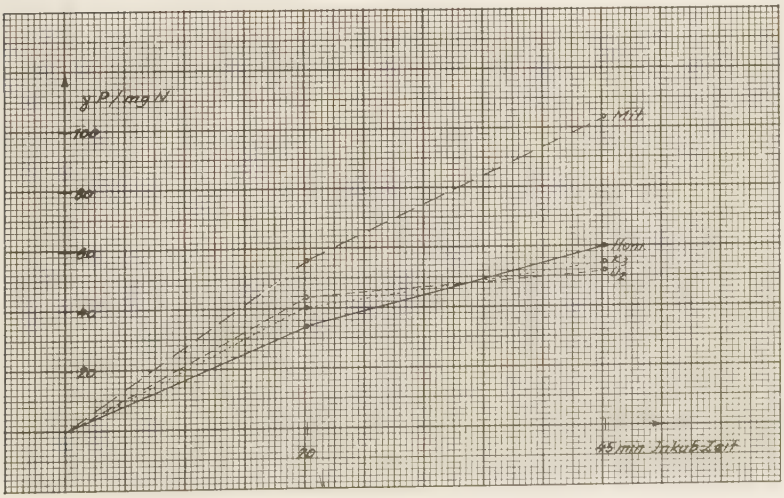

Abb. 5: Reaktionskurven des 33,3%igen Homogenats und der Zellfraktionen aus Versuch 5
- ATPase-Aktivität in γ P/mg N -

Zellfraktion	N-Gehalt		ATPase-Aktivität	
	mg/ml Hom.	%	γP/ml Hom./Std.	%
33,3%iges Homogenat	3,259	100,0	499	100,0
Daraus gewonnen:				
Zellkerne	0,207	6,4	29	5,8
Mitochondrien	0,242	7,4	76	15,3
Cytoplasma + Microsomen	2,854	87,8	419	84,0
	3,303	101,6	524	105,1

Tab. 12: Intrazelluläre Verteilung des Gesamtstickstoffs und der Gesamt-ATPase-Aktivität bei Carcinomgewebe des menschlichen Ovars

- Mittelwerte aus 2 Messungen -

Aktivität der Mitochondrien höher als ihr Anteil am Stickstoffgehalt der Zelle (s. hierzu Abb. 5).

6. Versuch: 53-jährige Patientin mit Granulosazelltumor, ausgehend vom linken Ovar, nicht Endoxan-behandelt

24,5 g Gewebe wurden mit 73,5 ml 30%iger Rohrzuckerlösung homogenisiert und ergaben 64 ml Homogenat. Hiervon wurden 51 ml zur Extraktion der Zellfraktionen verwendet (K_3 1 ml ad 50 ml aus 51 ml, Mit. 1 ml ad 10 ml aus 25 ml Homogenat).

Zellfraktion	N-Gehalt		ATPase-Aktivität	
	mg/ml Hom.	%	γ P/ml Hom./Std.	%
25%iges Homogenat	5,740	100,0	420	100,0
Daraus gewonnen:				
Zellkerne	1,450	25,5	24	5,7
Mitochondrien	0,810	14,1	74	17,6
Cytoplasma + Microsomen	3,070	53,5	302	72,0
	5,330	93,1	400	95,3

Tab. 13: Intrazelluläre Verteilung des Gesamtstickstoffs und der Gesamt-ATPase-Aktivität bei einem Granulosazelltumor des menschlichen Ovars

7. Versuch: 38-jährige Patientin mit Luteincysten des Ovars bei Blasenmole (Schwangerschafts-amenorrhoe)

83,5 g Gewebe wurden mit 167 ml 30%iger Rohrzuckerlösung homogenisiert und ergaben 248 ml Homogenat. Hiervon wurden 100 ml zur Extraktion der Zellfraktionen verwendet (K_3 1 ml ad 100 ml aus 100 ml, Mit. 1 ml ad 10 ml aus 25 ml Homogenat).

Zellfraktion	N-Gehalt		ATPase-Aktivität	
	mg/ml Homogenat	%	γ P/ml Hom./Std.	%
33,3%iges Homogenat	4,785	100,0	81	100,0
Daraus gewonnen:				
Zellkerne	0,184	4,0	8	9,9
Mitochondrien	0,232	4,9	68	84,0
Cytoplasma + Microsomen	4,568	95,6	0	0
	4,984	104,5	76	93,9

Tab. 14: Intrazelluläre Verteilung des Gesamtstickstoffs und der Gesamt-ATPase-Aktivität bei einem menschlichen Ovar mit Luteincysten bei Blasenmole

Eine völlig aus dem Rahmen fallende Ausnahme bildet das Ovar mit Luteincysten bei Blasenmole, bei dem sich fast die gesamte ATPase in der Mitochondrienfraktion findet bei nur 4,9 % Stickstoffanteil der Mitochondrien am Gesamtstickstoff.

Die nachfolgenden drei Aufstellungen zeigen die intrazelluläre Verteilung der ATPase-Aktivität beim Gesamtovar und Corpus luteum vom Schwein.

Zellfraktion	N-Gehalt		ATPase-Aktivität	
	mg/ml Homogenat	%	γ P/ml Hom./Std.	%
33,3%iges Homogenat	3,830	100,0	937	100,0
Daraus gewonnen:				
Zellkerne	0,168	4,4	26	2,8
Mitochondrien	0,123	3,2	154	16,5
Cytoplasma + Microsomen	3,467	90,6	756	80,6
	3,758	98,2	936	99,9

Tab. 15: Intrazelluläre Verteilung des Gesamtstickstoffes und der Gesamt-ATPase-Aktivität des Gesamtovars vom Schwein

- Mittelwerte aus 2 Messungen -

8. Versuch: 7,7 g Corpus luteum wurden mit 23 ml 30%iger Rohrzuckerlösung homogenisiert und ergaben 22 ml Homogenat. Hiervon wurden 18 ml zur Extraktion der Zellfraktionen verwendet (K_3 1 ml ad 50 ml, Mit. 1 ml ad 10 ml).

Zellfraktion	N-Gehalt		ATPase-Aktivität	
	mg/ml Homogenat	%	γP/ml Hom./Std.	%
25%iges Homogenat	3,680	100,0	1 000	100,0
Daraus gewonnen:				
Zellkerne	0,268	7,3	255	25,5
Mitochondrien	0,370	10,1	143	14,3
Cytoplasma + Microsomen	3,080	83,6	610	61,0
	3,718	101,0	1 008	100,8

Tab. 16: Intrazelluläre Verteilung des Gesamtstickstoffs und der Gesamt-ATPase-Aktivität des Corpus luteum vom Schwein

Zellfraktion	N-Gehalt		ATPase-Aktivität	
	mg/ml Homogenat	%	γP/ml Hom./Std.	%
33,3%iges Homogenat	3,260	100,0	939	100,0
Daraus gewonnen:				
Zellkerne	0,070	2,1	31	3,3
Mitochondrien	0,209	6,4	57	6,1
Cytoplasma +Microsomen	2,940	90,1	818	87,2
	3,219	98,6	906	96,6

Tab. 17: Intrazelluläre Verteilung des Gesamtstickstoffs und der Gesamt-ATPase-Aktivität des Corpus luteum vom Schwein

- Mittelwerte aus 3 Messungen -

Diskussion

In menschlichen Ovarien konnte durch unsere Versuche eine Aktivität der alkalischen Phosphatase von 14 γ P/mg N/Std., der sauren Phosphatase von 28 γ P/mg N/Std. nachgewiesen werden. Die saure Phosphatase ist demnach etwa doppelt so aktiv wie die alkalische, während JUNG und E. KIDESS[17] in Schweineovarien für beide Phosphatasen eine etwa gleiche Aktivität, und zwar 0,914 mg P/g Frischgewebe pro Std. für die alkalische Phosphatase und 0,736 mg P/g Frischgewebe pro Std. für die saure Phosphatase feststellten. Dies bedeutet, daß die alkalische Phosphatase im Gesamtschweineovar etwa 6mal, die saure knapp 2,5mal so aktiv ist wie im menschlichen Ovar. Als Vergleichszahl für die ATPase fanden wir beim Schweineovar die im Rahmen dieser Arbeit höchste Aktivität mit 480 γ P/mg N/Std., gegenüber nur 179 γ P/mg N/Std. beim Menschen.

Der menschliche Eierstock ergab auch bei früheren Fermentbestimmungen erheblich niedrigere Aktivitäten als das Organ des Schweins. JUNG und E. KIDESS[17] sehen die Ursache hierfür in der Tatsache, daß im menschlichen Ovar jeweils nur ein Follikel heranreift, während im etwa gleich großen Tierorgan stets mehrere reife Follikel gleichzeitig vorhanden sind, also ein Unterschied in der Organleistung besteht.

Zwei um die Zeit des Follikelsprungs operativ entfernte menschliche Ovarien ließen eine auffallend hohe Aktivität der alkalischen und sauren Phosphatase erkennen. Die höchste hierbei gemessene Aktivität der alkalischen Phosphatase liegt mit 89 γ P/mg N/Std. erheblich über dem mit 14 γ P/mg N/Std. errechneten Mittelwert aus allen übrigen Versuchen. Bei der sauren Phosphatase steht

dem Mittelwert von 28γ P/mg N/Std. eine maximale Aktivität von 108γ P/mg N/Std. gegenüber. Hierin scheint eine direkte Abhängigkeit des Fermentgehaltes vom mensuellen Cyclus zum Ausdruck zu kommen. Interessant ist, daß BERGER und MUMPRECHT[4] auch am Endometrium mit Hilfe histochemischer Reaktionen feststellten, daß die alkalische Phosphatase erst in der späten Proliferationsphase auftritt, kurz vor dem Follikelsprung ihr Maximum hat und in der Sekretionsphase sofort wieder abfällt, während die saure Phosphatase schon zu Beginn der Proliferationsphase auftritt und ihr Maximum ebenfalls kurz vor dem Follikelsprung erreicht. Bei der ATPase tritt eine solche Abhängigkeit nicht so deutlich in Erscheinung; die gemessenen Werte liegen in der Proliferationsphase um 150γ P/mg N/Std. und steigen bis gegen die Mitte der Sekretionsphase auf 217γ P/mg N/Std. an.

In der Follikelflüssigkeit aus Schweineovarien wurde nur die ATPase-Aktivität gemessen. Sie beträgt bei kleinen Follikeln 101γ P/mg N/Std., bei mittleren 55γ P/mg N/Std. und bei grossen 27γ P/mg N/Std. Diese Relation zwischen Follikelgröße und Fermentaktivität wurde auch von JUNG und HELD[15] beobachtet und damit erklärt, daß die Funktion der Granulosazellen, die als Entstehungsort für die Phosphatasen angenommen werden, in kleinen Follikeln wohl am höchsten ist und mit der Follikelreifung erheblich abnimmt. Dieser Befund stimmt mit den histochemischen Ergebnissen verschiedener Autoren überein. So wiesen MOSS und Mitarbeiter[28] am Rinderovar nach, daß die alkalische Phosphatase mit dem Follikelwachstum in den Epithelzellen ab- und in den Thekazellen zunimmt. WIMSATT[34] konnte

in den Granulosazellen reifer Follikel der Fledermaus keine Phosphatase nachweisen.

Im Corpus luteum menstruationis des Menschen erwies sich besonders die alkalische Phosphatase im Vergleich zum Gesamtovar als vermehrt. Sie ist bei einem Gelbkörper "in Blüte" mit 128 γ P/mg N/Std. etwa 9mal höher als im Gesamtovar, während die saure Phosphatase mit 138 γ P/mg N/Std. etwa auf das 5fache erhöht ist. Damit ist im Corpus luteum des Menschen - im Gegensatz zum menschlichen Gesamtovar und zum Corpus luteum des Schweins - die Aktivität der sauren Phosphatase nicht größer als die der alkalischen Phosphatase. Es sei an dieser Stelle nochmals auf die von JUNG[14] nachgewiesene hohe Aktivität der sauren Phosphatase mit 201 γ P/mg N/Std. und vor allem der alkalischen Phosphatase mit 376 γ P/mg N/Std. im Schwangerschaftsgelbkörper hingewiesen (s. hierzu Abb. 6).

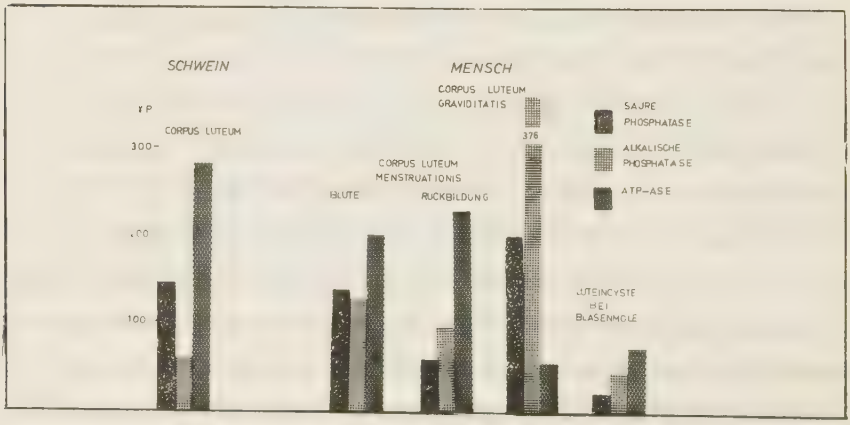

Abb. 6: Phosphataseaktivität im Corpus luteum vom Menschen und Schwein (nach JUNG[14])

Im Corpus luteum vom Schwein fanden JUNG und A. KIDESS[16] eine mehr als doppelt so hohe Aktivität der sauren gegenüber derjenigen der alkalischen Phosphatase. Die von ihnen ermittelten Werte betragen 60 γ P/mg N/Std. für die alkalische und 145 γ P/mg N/Std. für die saure Phosphatase. Beim Corpus luteum ist demnach die alkalische Phosphatase im menschlichen Gewebe aktiver, die saure Phosphatase gleich aktiv wie beim Schwein.

Die ATPase-Aktivität liegt beim menschlichen Corpus luteum in derselben Größenordnung wie beim Gesamtovar, hingegen bleibt sie beim Corpus luteum und noch mehr beim Corpus rubrum vom Schwein hinter der des Gesamtovars zurück.

Im Ovarialcarcinom beträgt die Aktivität der alkalischen Phosphatase mit 107 γ P/mg N/Std. etwa das 8fache, die der sauren Phosphatase mit 72 γ P/mg N/Std. etwa das 2,5fache der Normalwerte. Die ATPase ist nicht signifikant erhöht.

Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang der Vergleich zwischen einem mit Endoxan behandelten und einem nicht behandelten Granulosazelltumor. In der Endoxan-behandelten Geschwulst ist die Aktivität der alkalischen Phosphatase 10mal, die der sauren Phosphatase doppelt so hoch wie in dem nicht behandelten Tumor.

Die Erhöhung der alkalischen Phosphatase beim untersuchten Schwangerschaftsovar könnte sowohl auf das bei der Patientin vorhandene Uteruscarcinom zurückzuführen sein als auch von der Schwangerschaft herrühren. Durch W. JUNG und STARK[18] ist bekannt, daß die alkalische Serumphosphatase in der Schwan-

gerschaft erhöht ist.

Die intrazelluläre Verteilung der Phosphatasen entspricht beim Carcinom sowie beim Gesamtovar und Corpus luteum vom Schwein etwa der von JUNG und E. KIDESS[17] angegebenen Aufstellung. Die Mitochondrienfraktion zeigt fast überall eine höhere Fermentaktivität, als ihrem Anteil am Gesamtstickstoffgehalt der Zelle entspräche. Dies fällt besonders bei dem Ovar mit Luteincysten bei Blasenmole auf, bei dem die ATPase sogar fast ausschließlich in den Mitochondrien zu finden war. ABDERHALDEN[1] schreibt den Mitochondrien eine zentrale Stellung im Fermentstoffwechsel der Zelle zu, was zweifellos auch für diese Untersuchungen gilt.

In einem Versuch mit Carcinomgewebe konnte die Aktivität der alkalischen und sauren Phosphatase in der Microsomenfraktion getrennt erfaßt werden und überraschte durch ihre hohen Werte von 18,9 % der alkalischen und 36,2 % der sauren Phosphataseaktivität bei einem Anteil der Microsomen am Stickstoff der Zelle von nur 3,8 %.

Die mit diesen Versuchen erfaßte intrazelluläre Verteilung der Phosphatasen weicht vor allem hinsichtlich der Mitochondrienaktivität von der durch SIEBERT, JUNG und LANG[33] für die saure Phosphatase in der Bullenprostata aufgezeigten Verteilung ab.

Unsere Untersuchungen führen zu der sicheren Annahme, daß die Phosphatasen im Ovar besondere, über den normalen Stoffwechsel der Zelle hinausgehende Aufgaben zu erfüllen haben.

Zusammenfassung

Im ersten Teil der Arbeit gingen wir kurz auf Vorkommen und Aufgabe der alkalischen und sauren Phosphatase sowie der ATPase ein. Es wurden Literaturstellen zusammengetragen, die über einen Nachweis der genannten Fermente im Ovarium berichten. Der experimentelle Teil beginnt mit einer Beschreibung der Versuchsanordnung und enthält Aufstellungen über die Ergebnisse, getrennt nach menschlichem und Schweineovargewebe.

Das Ovar des Menschen zeigt eine Phosphataseaktivität, durch die bei pH 9,0 14 γ P/mg N/Std. freigesetzt werden, bei pH 5,0 28 γ P/mg N/Std. Die ATPase-Aktivität beträgt 179 γ P/mg N/Std.

Demgegenüber ist die alkalische Phosphatase bei einem Corpus luteum "in Blüte" auf das 9fache, die saure Phosphatase auf das 5fache erhöht. Die ATPase liegt in derselben Größenordnung wie beim Gesamtovar.

Im Carcinomgewebe ist die alkalische Phosphatase 8mal, die saure 2,5mal aktiver als im nicht pathologisch veränderten Ovar. Die ATPase erscheint nicht signifikant erhöht.

Beim Schweineovar mit kleinen Follikeln beträgt die ATPase-Aktivität 480 γ P/mg N/Std., bei Organen älterer Tiere mit Corpora lutea und Corpora rubra 321 γ P/mg N/Std.

Die Follikelflüssigkeit kleiner Follikel ist mit 101 γ P/mg N/Std. reicher an ATPase als die mittlerer Follikel. Bei großen Follikeln beträgt die ATPase-Aktivität nur noch 25 %.

Im Corpus luteum vom Schwein wurden durch ATPase nur 281 γ P/mg N/Std., im Corpus rubrum 147 γ P/mg N/Std. freigesetzt.

Die Frage einer direkten Abhängigkeit der Fermentaktivität des Ovars vom mensuellen Cyclus wird diskutiert.

Literaturverzeichnis

1	Abderhalden, R.	Klin. Enzymologie. Die Fermente in der Pathogenese, Diagnostik und Therapie. Stuttgart:Thieme 1958
2	Alamani, V., e P. Mangione	Valutazione istochimica delle strutture endocrine dell'ovario in rapporto alloro ciclo evolutive. Riv. ostetr. Firenze, 11, 689 (1956)
3	Arvy, L.	Contribution à l'histoenzymologie de l'ovaire. Z. Zellforschung 51, 406 (1960)
4	Berger, J. und E. Mumprecht	Beurteilung ovarieller Funktionsphasen am Endometrium mit Hilfe histochemischer Reaktionen. Schweiz. med. Wschr. 89, 433 (1959)
5	Corner, G. W.	Alkaline Phosphatase in the ovarian follicle and in the corpus luteum. Contr. Embryol. Carneg. Inst. 32, 1 (1948)
6	Deane, H. W.	Histochemical observations on the ovary and oviduct of the albino rat during the estrous cycle. Amer. J. Anat. 91, 363 (1952)
7	Fiske, C. H. and Y. Subbarow	Zit. nach K. Lohmann und L. Jendrassik, s. Lit. Ang. Nr. 24
8	Flaschenträger, B. und E. Lehnartz	Physiologische Chemie, Erster Band, S. 980. Berlin - Göttingen - Heidelberg: Springer 1951

9	Genesi, M.	Rilievi istotopographici sulla distribuzione della fosfatasi alcalina. Attivita enzimatica dell'ovario, dell' utero e delle formazioni annesiali parovariche umane in condizioni normali e patologiche. Minerva ginec. (Torino) 5, 302 (1953)
10	Hoffmann-Ostenhof, O.	Enzymologie, S. 342. Wien: Springer 1954
11	Hogeboom, G.H., W. C. Schneider und G. E. Palade	Zit. nach K. Lang u. G. Siebert, s. Lit. Ang. Nr. 21
12	Hudson, B. P. and M. London	Studies on the purifications of acid prostatic phosphatase. Arch. Biochem. 46, 141 (1953)
13	Jenner, H. D. and H. D. Kay	In Hoppe - Seyler /Thierfelder: Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, Fünfter Band, S. 176. Berlin - Göttingen - Heidelberg: Springer 1953
14	Jung, G.	Untersuchungen über proteolytische Enzyme des Ovarium. Habilitationsschrift Tübingen 1962
		Phosphatasen im Ovar. Vortrag auf der Tagung der Oberrhein. Ges.f. Geburtshilfe u. Gyn., Juni 1962, Baden-Baden
15	Jung, G. und H. Held	Über Fermente in der Follikelflüssigkeit. Arch. Gynäk. 192, 146 (1959)
	Held, H.	Untersuchungen über Fermente in der Follikelflüssigkeit. Inaug.-Diss. Tübingen 1959

16 Jung, G. und A. Kidess — Proteolytische Fermente und Phosphatasen im Corpus luteum und Corpus rubrum von Schweineovarien. Arch. Gynäk. 196, 457 (1962)

Kidess, A. — Untersuchungen über proteolytische Enzyme und Phosphatasen im Corpus Rubrum und Corpus Luteum vom Schwein. Inaug.-Diss. Tübingen 1962

17 Jung, G. und E. Kidess — Proteolytische Fermente im Ovargewebe. Arch. Gynäk. 192, 151 (1959)

Kidess, E. — Untersuchungen über Fermente im Ovargewebe. Inaug.-Diss. Tübingen 1960

18 Jung, W. und G. Stark — Die Ursache der Phosphataseerhöhung in der Spätschwangerschaft. Zbl. Gynäk. 78, 1201 (1956)

19 Kielley, W. W. und O. Meyerhof — Zit. nach O. Hoffmann-Ostenhof, s. Lit. Ang. Nr. 10

20 Kraut, H. und A. Weischer — Esterasen. In B. Flaschenträger und E. Lehnartz: Physiologische Chemie, Erster Band, S. 1070, Berlin - Göttingen - Heidelberg: Springer 1951

21 Lang, K. und G. Siebert — Aufarbeitung von Gewebe und Zellen. In Hoppe-Seyler / Thierfelder: Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, Zweiter Band, Zweiter Teil, S. 537. Berlin-Göttingen - Heidelberg: Springer 1955

22 Letterer, E. — Allgemeine Pathologie, S. 600. Stuttgart: Thieme 1959

23	Lobel, B. L., R. M. Rosenbaum und H. W. Deane	Enzymic correlates of physiological regression of follicles and Corpus luteum in ovaries of normal rats. Endocrinology 68, 232 (1961)
24	Lohmann, K. und L. Jendrassik	Kolorimetrische Phosphorsäurebestimmung im Muskelextrakt. Biochem. Z. 178, 419 (1926)
25	Malinou, S. H. and M. D. Reynolds	Acid phosphatases of the Lutz and Walker 256 tumors. Enzymologia (Den Haag) 21, 123 (1959)
26	Meyerhof, O.	Zit. nach O. Hoffmann-Ostenhof, s. Lit. Ang. Nr. 10
27	Moschino, A. e I. Parisotto	Le fosfatasi ovariche. Riv. Anat. Pat. 5, 855 (1952)
28	Moss, S. T. R. Wrenn and J. F. Sykes	Some histological and histochemical observations of the bovine ovary during the estrous cycle. Anat. Rec. 120, 409 (1954)
29	Novikoff, A. B. L. Hecht, E. Podber and J. Ryan	Phosphatases of Rat Liver. J. Biol. Chem. 194, 153 (1952)
30	Ober, K. G.	Die wechselnde Aktivität der alkalischen Phosphatase im Endometrium und Ovar während des mensuellen Zyklus sowie im Myometrium unter der Geburt. Eine histochemische Darstellung. Klin. Wschr. 28, 9 (1950)
31	Perry, S. V.	In S. P. Colowick and N. O. Kaplan: Methods in Enzymology, Vol. II, S. 582. New York: Academic Press Inc. Publishers 1955

32 Roemer, H. Über das regelmäßige Auftreten einer spezifischen Proteinase während des mensuellen Zyklus. Klin. Wschr. 24/25, 116 (1946/47)

Die Kontrolle der Ovarialfunktion durch den Nachweis eines spezifischen proteolytischen Fermentes. Arch. Gynäk. 186, 259 (1955)

33 Siebert, G., G. Jung und K. Lang Untersuchungen über die saure Phosphatase der Bullenprostata. Biochem. Zschr. 326, 464 (1959)

34 Wimsatt, W. S. Glycogen, polysacharide complexes and alkaline phosphatase in the ovary of the bat during hibernation and pregnancy. Anat. Rec. 103, 148 (1949)

Lebenslauf

Am 1. Februar 1930 wurde ich als Tochter des Oberamtsrats Robert Schmid und seiner Ehefrau Emma geb. Zeller in Besigheim geboren. Von 1936 bis 1940 besuchte ich in Stuttgart und Karlsruhe die Volksschule. Dann war ich Schülerin der Fichte-Oberschule in Karlsruhe und ab 1946 des Goldberg-Gymnasiums in Böblingen, wo ich im Juli 1949 die Reifeprüfung ablegte.

Von November 1949 bis April 1955 war ich Sekretärin des technischen Vorstandsmitgliedes der Württembergischen Metallwarenfabrik Geislingen und anschließend bis April 1958 bei der Firma Daimler-Benz AG. Stuttgart-Untertürkheim.

Vom Sommersemester 1958 bis einschließlich Sommersemester 1961 studierte ich an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen, im Wintersemester 1961/1962 an der Universität Wien Medizin. Darnach kehrte ich für weitere fünf klinische Semester nach Tübingen zurück und bestand hier im Dezember 1963 die ärztliche Prüfung.

Reproduktion und Druck Horst Bissinger KG, Magstadt